

SÉRIE A, N° 721

N° d'ordre :

747

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ (Mention Sciences)

PAR

Faredoon BHARUCHA

1^{re} THÈSE. "Recherches sur les facteurs de la formation des conidies en milieux liquides agités chez **penicillium caseicolum**, Bainier **P. candidum** Link et **Penicillium chrysogenum** Thom"

2^e THÈSE. Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 31 Mai 1956 devant la Commission d'examen.

M. CHOUARD, *Président.*

Mme HUREL, *Examinatrice.*

M. CHADEFAUD, *Examineur.*

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ (Mention Sciences)

PAR

Faredoon BHARUCHA

1^{re} THÈSE. "Recherches sur les facteurs de la formation des conidies en milieux liquides agités chez **penicillium caseicolum**, Bainier **P. candidum** Link et **Penicillium chrysogenum** Thom"

2^e THÈSE. Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 31 Mai 1956 devant la Commission d'examen.

M. CHOUARD, *Président.*

Mme HUREL, *Examinatrice.*

M. CHADEFAUD, *Examineur.*



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen. . . . J. PERES

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	PETIT	T	Biologie maritime.
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique.	QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
R. LEVY	T	Physiologie comparée.	GALLIEN	T	Embryologie.
FOCH	T	Mécanique phys. et expér.	EICHHORN	T	Biologie végétale (P.C.B.).
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale.	DE CUGNAC	T	Biologie végétale.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.	Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
JOB	T	Chimie générale.	THELLIER	T	Chimie physique.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comp.	AUDUBERT	T	Electrochimie.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	L'HERITIER	T	Génétique.
PERES	T	Mécanique des fluides.	GRIVET	T	Radioélectricité.
LAUGIER	T	Physiologie générale.	PONCIN	T	Mécanique des fluides.
M. CURIE	T	Physique (P.C.B.).	THIRY	T	Mécanique appliquée.
BARRABE	T	Géologie struct. et Géologie appliquée.	DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
G. DARMOIS	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.	QUELET	T	Chimie organique.
BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
Mme JOLIOT-CURIE	T	Physique nucléaire et radioactivité.	CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
PLANTEFOL	T	Botanique.	CUVILLIER	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
CABANNES	T	Recherches physiques.	JUNG	T	Pétrographie.
GRASSE	T	Evol. des êtres organisés.	TRILLAT	T	Chimie physique.
PREVOST	T	Chimie organique.	WIEMANN	T	Chimie (M.P.C.).
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
WYART	T	Minéralogie.	DESTOUCHES	T	Théories physiques.
TEISSIER	T	Zoologie.	PRUVOST	T	Géologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale.	AMIEL	T	Chimie (P.C.B.).
P. AUGER	T	Physique quantique et Relativité.	HOCART	T	Minéralogie.
MONNIER	T	Physiologie des fonctions.	J.-P. MATHIEU	T	Physique (P.C.B.).
PIVETEAU	T	Géologie.	COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.).
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).	MAY	T	Biologie animale (P.C.B.).
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).	CHOQUET	T	Calcul différentiel et intégral.
LAFFITTE	T	Chimie générale.	FELDMANN	T	Biologie (P.C.B.).
FAVARD	T	Mécanique générale.	GUINIER	T	Physique (P.C.B.).
COULOMB	T	Physique du Globe.	JOST	T	Biologie (P.C.B.).
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (P.C.B.).	FORTET	T	Calcul des probabilités.
CHRETIEN	T	Chimie minérale.	SCHWARTZ	T	Méthodes mathématiques de la Physique.
P. DRACH	T	Zoologie.	CHOUARD	T	Physiologie végétale.
KASTLER	T	Physique.	MALAVARD	T	Aviation.
EPHRUSSI	T	Génétique.	BRELOT	T	Calcul différentiel.
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.	NORMANT	T	Chimie (P.C.B.).
RIVIERE	T	Géologie (S.P.C.N.).	BENARD	T	Chimie (P.C.B.).
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).	BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
LUCAS	T	Physique.	DUCUE	T	Statistiques mathématiques.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.	GELOSO	T	Chimie (S.P.C.N.).
ARNULF	T	Optique appliquée.	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
M. MORAND	T	Physique.	ULRICH	T	Physiologie végétale.
SOLEILLET	T	Physique.	MARECHAL	T	Optique théorique et appliquée.
FORTIER	T	Mécan. expér. des fluides.	KIRRMANN	T	Théories chimiques.
DANJON	T	Astronomie.	CHADEFAUD	T	Botanique.
FROMAGEOT	T	Chimie biologique.	DESTRIAU	T	Physique (M.P.C.).
LAPORTE	T	Physique génér. et Radioactivité.	Mlle LE BRETON	T	Physiologie générale.
JANET	T	Méc. anal. et Méc. céleste.	SALEM	T	Mathématiques générales.
			ESCLANCON	T	Physique (P.C.B.).
			LELONG	T	Mathématiques générales.
			SECRÉTAIRE GÉNÉRAL		C. MONIER.

A Monsieur le Professeur CHOUARD

Professeur de Physiologie Végétale
à la Faculté des Sciences de Paris

qui m'a fait le grand honneur d'accepter la présidence
de cette thèse et m'a encouragé de ses précieux conseils,

En signe de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur CHADEFAUD

Professeur à la Faculté des Sciences de Paris

En hommage de ma sincère reconnaissance.

A Madame HUREL

Professeur à la Faculté des Sciences de Paris

En hommage de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jacques TREFOUEL

Directeur de l'Institut Pasteur

Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine

qui m'a permis de travailler dans l'illustre Maison de
Pasteur

En témoignage de vive gratitude et de profond respect.

A Monsieur le Professeur Maurice LEMOIGNE

Membre de l'Institut

Membre de l'Académie d'Agriculture

Chef du Service des Fermentations

à l'Institut Pasteur

qui m'a accueilli dans son service, m'a guidé dans
mes études et conseillé dans mon travail.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma
respectueuse reconnaissance.

A Monsieur Norbert GRELET, Agrégé de Sciences Naturelles,
Chargé de Recherches au C.N.R.S. qui a inspiré et dirigé
constamment ce travail. Je n'oublierai jamais avec quelle
patience et quel dévouement il m'a aidé dans mes recherches.
Qu'il me permette de l'assurer de ma vive et sincère recon-
naissance. Sans son aide et ses conseils, il m'eût été
difficile de mener à terme cette étude.

A tous mes collègues du Service des Fermentations à
l'Institut Pasteur de Paris, qui m'ont aidé de leurs
avis et de leurs conseils amicaux.

A tous ceux dont la bienveillante intervention m'a
permis de poursuivre mes études en France.

RECHERCHES SUR LES FACTEURS DE LA FORMATION DES CONIDIES
EN MILIEUX LIQUIDES AGITES
CHEZ *PENICILLIUM CASEICOLUM* BAINIER (*PENICILLIUM CANDIDUM* LINK)
ET *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* THOM

I N T R O D U C T I O N

Les appareils de multiplication, de dissémination ou de survie chez les champignons, présentent une grande diversité. Cependant ils comportent, dans la plupart des cas, des masses cellulaires, uni ou multi-nuclées, mono- ou pluricellulaires, de taille microscopiques, qui reçoivent très généralement le nom de "spores".

Dans la nature, comme dans les conditions habituelles de culture sur milieu solide au laboratoire, le champignon commence à se développer en un mycélium végétatif, et la sporulation se produit en un second temps : une nouvelle morphogénèse, aboutissant parfois à des appareils très complexes, est ainsi mise en jeu par un ensemble de facteurs dont de nombreux auteurs se sont déjà attachés à préciser la nature.

On a pu penser que les conidiophores de ces champignons dressés à la surface des mycélia développés sur milieu solide, étaient des formations aériennes.

Mais vers 1945, pour la production de la pénicilline, on a réalisé des cultures de Penicillium "en profondeur", soit en

flacons agités, soit en cuves munies d'un dispositif d'aération et d'agitation. Or, dans certaines conditions de culture et de milieu, des conidiophores se forment dans les mycelia immergés.

Nous avons repris l'étude des facteurs de la formation des conidiophores en milieu liquide agité.

La plus grande part du travail que nous présentons est consacrée à l'espèce Penicillium caseicolum. Bainier. (Penicillium candidum. Link).

Nous avons également fait quelques expériences avec la souche productrice de pénicilline : Penicillium chrysogenum Thom, souche Wis Q 176.

Nous avons d'abord cherché si l'apparition des conidiophores est liée dans la culture submergée, à l'épuisement de l'aliment carboné, ou de l'aliment azoté, ou de quelque autre constituant.

Nous avons, par la suite, reconnu l'importance du pH initial des cultures, et nous nous sommes efforcé d'expliquer l'effet observé.

Nous avons ainsi été conduit à faire l'hypothèse, appuyée par plusieurs expériences, selon laquelle des espèces de champignons qui peuvent croître dans des milieux synthétiques simples sans acides aminés, ni facteurs de croissance, présentent toutefois des besoins accessoires en azote aminé, qui jouent un rôle dans le déterminisme de la formation des conidies.

HISTORIQUE

Etant donné la profonde différence qui existe entre la reproduction sexuée et la reproduction asexuée des champignons, il serait convenable d'analyser séparément les travaux qui leur sont consacrés.

Mais l'effet des mêmes facteurs a été étudié vis à vis de l'une et de l'autre, parfois par les mêmes auteurs.

Une même espèce peut d'ailleurs présenter à la fois une reproduction sexuée et une reproduction asexuée, qui ne répondent pas nécessairement au même déterminisme.

Quand une souche possède génétiquement l'aptitude à former un appareil de reproduction sexuée ou asexuée, la réalisation de cet appareil est gouvernée par des facteurs externes, que nous allons passer en revue; on a étudié ainsi les facteurs liés à la composition du milieu (cations, aliments carbonés et azotés, facteurs de croissance, pH) et les facteurs liés aux conditions de culture (température, humidité, aération, lumière).

Cations.

La relation qui existe entre la présence de certains cations dans le milieu et la reproduction des champignons, est apparue très tôt aux chercheurs de l'école pastorienne.

RAULIN, dans sa thèse célèbre de 1780 (45), étudie le développement d'Aspergillus niger en milieu synthétique et observe l'influence favorable exercée par l'addition de fer; il écrit : "en absence de sels de fer, les spores se forment de plus en plus péniblement à mesure que le liquide d'où elles naissent a déjà produit un plus grand nombre de récoltes".

Plus tard, LINOSSIER 1910 (35), puis SAUTON 1910 (47) ont confirmé cette dernière observation. Pour SAUTON, "la présence simultanée du fer et de l'oxygène semble nécessaire à la formation des spores".

D'autre part, en 1911 (32) JAVILLIER et SAUTON ont également prouvé que le zinc joue un rôle important : "en présence de fer et de zinc, il se forme des conidies; quand on supprime le fer, le mycélium reste stérile, mais cela est dû moins à l'absence du fer qu'à la présence du zinc, en effet en l'absence simultanée de fer et de zinc, la moisissure, mal développée, se couvre toutefois de conidies noires".

Avec Gabriel BERTRAND 1912 (8) le rôle capital du manganèse est mis en évidence : "en présence de fer et de zinc, les très minimes quantités de manganèse apportées comme impuretés suffisent à permettre une belle croissance, mais le mycélium reste stérile; l'addition de manganèse détermine la production des conidies".

Enfin SAUTON 1913 (48) étudie A. fumigatus et constate qu' "en présence de manganèse, les conidies ne se forment pas si le fer fait défaut, et cela aussi bien en présence qu'en absence de zinc".

Les rapports mutuels de Fe, de Zn et de Mn jouent donc un rôle dans la croissance et la formation des conidies d'A. niger et A. fumigatus cultivés à la surface d'un milieu synthétique.

De nombreux travaux concernant les besoins minéraux d'A. niger ont été publiés ces dernières années, mais ils ne donnent généralement aucune indication sur la formation de conidies.

A la suite d'une longue série des travaux, STEINBERG 1950 (50) a précisé la nécessité des cations K, MG, Fe, Zn, Cu, Mn, Mo et Ca pour la croissance d'A. niger, mais il ne parle pas de leur effet sur la sporulation.

PONGRATZ 1950 (43) remarque qu'une addition de cuivre dans le milieu synthétique entraîne un changement de couleur des conidies d'A. niger qui passent du jaune au brun noir.

La sporulation de Penicillium a été beaucoup moins étudiée que celle d'Aspergillus. Mais dans les années récentes, la formation des conidies dans les cultures de Penicillium notatum en milieu liquide agité a été observée.

Dans ces conditions, FOSTER, Mc DANIEL, WOODRUFF et STOKES 1945 (18) ont montré qu'une concentration relativement élevée de calcium, dans un milieu quasi-synthétique, favorise une formation abondante de conidies.

GILBERT et HICKEY 1946 (21), ont également fait des cultures agitées de P. notatum : l'addition d'une quantité modérée de fer supprime la formation de pénicilline, et entraîne la sporulation; pour une quantité plus forte de fer, la croissance est fortement diminuée, et la sporulation ne se produit plus.

La nutrition minérale de Penicillium chrysogenum souche Q 176 a été étudiée en détail par JARVIS et JOHNSON 1950 (31) au double point de vue des effets sur la croissance et sur la production de pénicilline, mais sans qu'il soit fait mention d'effets éventuels sur la sporulation.

Sur milieu gélosé, ARIMA, TANAKA, MASUDA 1951 (2) constatent que la formation des conidies est favorisée par la présence de cobalt, baryum, calcium, magnésium, zinc et aluminium.

MARAVAIHAS 1951 (39) a aussi étudié l'effet de la concentration du cuivre sur la sporulation de Penicillium lilacinum en milieu liquide stationnaire.

BRIAN, HEMMING 1950 (11), étudiant le champignon producteur des antibiotiques viridine et gliotoxine : Trichoderma viride, ont observé que le magnésium et le calcium favorisent la sporulation; que le fer est indispensable pour la croissance et la sporulation optimales, et que le cuivre est nécessaire à la couleur verte des spores.

STOCKDALE 1953 (51) a trouvé que zinc, fer, cuivre et manganèse additionnés à un milieu préalablement traité pour enlever les oligo-éléments, stimulent la croissance et la sporulation de Trichophyton persicolor.

Ajoutons encore que les recherches de BASU 1951 (6), 1952 (7) sur la reproduction asexuée chez Chaetomium globosum et Chaetomium brasiliensis, indiquent que le calcium est nécessaire pour la formation des périthèces, mais non pour la croissance végétative.

L'effet favorable exercé par l'extrait de jute sur la formation des périthèces dans ces espèces, s'explique d'ail-

leurs aussi en partie par le calcium qu'il contient.

Aliments carbonés et azotés, et facteurs de croissance.

Il serait difficile d'analyser sous des rubriques différentes, les effets produits par la concentration et la nature des aliments carbonés, des aliments azotés et des facteurs de croissance, car de nombreuses publications suggèrent des relations entre ces facteurs pris deux à deux.

C'est principalement le cas pour les aliments carbonés et les facteurs de croissance.

1. Reproduction asexuée.

Citons d'abord un travail de EMERIQUE-BLUM 1942 (17) consacré à la formation de thiamine par Aspergillus niger cultivé sur le milieu de Raulin : le maximum de thiamine dosée par rapport au mycélium total est trouvé en fin de culture, au stade de la sporulation.

Pour d'autres champignons, la thiamine ne peut être synthétisée en quantités suffisantes pour la croissance ou la sporulation.

MAGROU et MARNEFFE 1946 (38) ont reconnu que les appareils conidiophores d'une Moniliale Stilbacée, ne peuvent se former sur milieu contenant glucose et nitrate, à moins que soit présente la thiamine; celle-ci peut être remplacée par sa moitié thiazol, mais non par sa moitié pyrimidine.

BARNETT et LILLY 1950 (5) ont étudié une Mucorale : Choanephora cucurbitarum, qui produit des têtes conidiennes en plus grand nombre si le milieu contient beaucoup de thiamine et une concentration limitante de glucose, que s'il contient trop peu de thiamine ou trop peu de glucose.

Dans son rapport de 1954 (28), HAWKER cite un travail de TONSWEND 1952 (54) avec Botrytis (Sclerotinia) sur les effets des concentrations respectives de l'aliment carboné et de l'aliment azoté; Botrytis produit soit des conidies, soit des sclérotés; une concentration élevée d'azote favorise la production des conidies, tandis qu'une concentration élevée d'aliment carboné favorise la production des sclérotés.

Il ne faut pas prendre pour un phénomène général la relation qui paraît s'établir ci-dessus entre l'épuisement de l'aliment carboné et la sporulation.

Une Moniliiale, Memnoniella echinata, étudiée par BUSTON et BASU 1948 (12) a besoin de biotine pour croître; lorsque la biotine est en quantité suffisante, les conidies se forment à un moment où il reste encore beaucoup de glucose non utilisé; par conséquent, l'épuisement de l'aliment carboné n'est pas chez ce champignon la cause de la production des conidies.

Quelques travaux orientent l'attention vers le rôle que peut jouer l'aliment azoté dans le mécanisme de la sporulation.

Dans l'industrie de la pénicilline, les conidies nécessaires à l'ensemencement des milieux de production sont préparées sur des milieux gélosés contenant des produits naturels complexes. De tels milieux de sporulation sont décrits par MOYER et COGHILL 1946 (40), et par GALLEY et coll. 1946 (20).

Dans une étude de la production des spores de Penicillium notatum, FRANK, CALAM, et GREGORY 1948 (19) ont pu supprimer la peptone et les autres produits naturels, et obtenir de bonnes récoltes de conidies sur un milieu synthétique gélosé

contenant lactose, glucose, glycérol, acide organique (citrique), tartrique ou succinique) et ammoniacque.

En culture agitée, GILBERT et HICKEY 1946 (21) observent la formation des conidies de Penicillium notatum dans un milieu où l'azote est apporté par des substances naturelles telles que la liqueur de macération de maïs ("corn steep liquor") ou les vinasses de distillerie de grain. L'addition d'azote minéral, sous forme de nitrate de sodium, accélère et prolonge la croissance, mais retarde la sporulation.

De même, BRIAN et HEMMING 1950 (11) avec Trichoderma viride qui est aussi une Moniliale, reconnaissent que les conidies se forment en surface plus abondamment lorsque le milieu contient moins d'azote. Plus précisément, les conditions qui favorisent une vigoureuse croissance, tendent à réduire le nombre des spores par gramme de mycélium, bien que le nombre total des spores puisse se trouver accru.

2. Reproduction sexuée.

On trouve de nombreux travaux sur les facteurs de la formation des périthèces chez les Ascomycètes.

Un Pyrenomycète, Sordaria (Melanospora) destruens, a été longuement étudié par HAWKER qui a montré que ce champignon exige la biotine pour croître, et la thiamine non pour croître, mais pour former des périthèces. Dans une série de publications récentes, de 1947 (25) et 1948 (26) (27), HAWKER compare les effets de différents aliments carbonés et observe que les périthèces se forment plus facilement sur glucose, fructose ou saccharose que sur un glucide plus complexe. L'auteur pense qu'il y a une concentration d'hexose optimale pour la formation des périthèces et que l'aliment glucidique le

plus favorable est celui qui est hydrolysé à la vitesse convenable pour maintenir cette concentration optimale. Le saccharose apparaît comme le plus favorable; il est possible que ce soit parce qu'il est plus rapidement phosphorylé que le glucose et le fructose; en effet l'addition d'hexose-phosphates en petite quantité à un milieu contenant du glucose favorise beaucoup la fructification (26).

Dans une série de travaux sur divers Pyrenomycètes BARNETT et LILLY ont étudié les effets sur la formation des périthèces, à la fois de la concentration des aliments et de la concentration des facteurs de croissance exigés par le champignon.

En 1947 (3) (33), ces auteurs montrent que, pour Sordaria fimicola, la biotine est indispensable, et que la thiamine est un facteur de croissance accessoire. La thiamine, peut être remplacée par sa moitié pyrimidine, mais non par sa moitié thiazole. En absence de thiamine les acides organiques s'accumulent, et si le pH initial est déjà bas, il finit au cours de la culture pour atteindre une valeur si basse que la croissance s'arrête et que les périthèces ne peuvent se former.

L'effet de la biotine est différent; si elle est présente à concentration limitante, les périthèces ne se forment que si les aliments sont eux-mêmes à concentration initiale réduite, par exemple si le milieu usuel a été dilué; si au contraire, la biotine est à concentration suffisante pour permettre l'utilisation de beaucoup d'aliments, la croissance se poursuit jusqu'à l'apparition des périthèces.

Des résultats analogues ont été obtenus par BARNETT et LILLY 1947 (4) avec Ceratostomella fimbriata : les péri-

thèces ne se forment que lorsque, dans le milieu initial, il y a beaucoup de thiamine par rapport à la quantité d'aliments à épuiser. Mais la thiamine paraît jouer aussi un rôle direct dans la formation des périthèces : en effet un mycélium qui s'est développé dans des conditions de carence en thiamine, et qui est transféré en eau distillée, ne forme de périthèces que si l'on ajoute de la thiamine.

Les mêmes auteurs en 1949 (34) ont aussi étudié l'influence de la concentration des aliments, de la thiamine, et de la biotine, sur la croissance et la formation des périthèces et des ascospores de Chaetomium convolutum.

L'espèce Chaetomium globosum a fait l'objet de recherches approfondies à la suite d'une première publication de BUSTON et BASU 1948 (12) : les auteurs constatent qu'avec un sucre aisément assimilable, tel que le glucose, maltose, cellobiose ou saccharose, les périthèces n'apparaissent qu'après disparition du sucre, c'est à dire tardivement si la concentration de sucre est élevée; au contraire avec dextrine, amidon ou cellulose, les périthèces apparaissent précocement, dans les mêmes délais qu'avec une faible concentration d'un sucre plus assimilable.

BASU et BOSE 1950 (8) ont démontré avec plusieurs espèces de Chaetomium que la pénurie d'aliments carbonés et azotés stimule la fructification, tandis que les produits de déchets l'inhibent.

En s'inspirant des conditions naturelles de la fructification de Chaetomium globosum, BUSTON et BASU 1948 (12) ont montré qu'un extrait de jute stimule la formation des périthèces. Des travaux de 1950 (8), 1951 (6) (14) ont recherché l'explication de cet effet.

En 1953 (13) BUSTON, JABBAR et ETHERIDGE ont réussi à remplacer l'extrait de jute par un mélange artificiel de glucose 6 phosphate, fructose 1-6 diphosphate et calcium. Ce résultat est intéressant car il montre dans quelle voie on peut espérer élucider le rôle de produits naturels complexes qui stimulent la sporulation.

Ainsi MRAK et collaborateurs 1942 (41) proposent pour la production des ascospores par les levures, des milieux contenant des extraits végétaux, et WILLIAMS et NEWTON 1951 (55) essayent d'isoler de l'extrait de tomate, la substance qui stimule la sporulation de la levure Hansenula mrakii.

En résumé, on voit par cet ensemble de travaux que la phénomène que nous avons désigné globalement par "sporulation" peut comporter des modalités et des déterminismes très variés :

facteurs de croissance, aliments carbonés, aliments azotés peuvent jouer, d'une espèce à l'autre, des rôles tout différents dans le mécanisme de la reproduction sexuée ou asexuée.

pH.

En général, l'intervalle des pH est plus étroit pour la sporulation que pour la croissance.

GILBERT, HICKEY 1946 (21) ont trouvé que les pH qui permettent la sporulation sont compris entre 5,0 et 6,5 chez Penicillium notatum cultivé en milieu liquide agité.

LILLY, BARNETT 1947 (33) ont étudié l'influence du pH sur la croissance mycélienne, et la formation des périthèces chez Sordaria fimicola. Dans un milieu liquide agité, contenant glucose, hydrolysate de caséine et biotine,

il y a une acidification au cours de la croissance. Le pH initial minimum est entre 3,8 et 4,0; si le milieu contient en plus de la thiamine, le départ des cultures a lieu à un pH initial plus bas : 3,6 - 3,8. A pH initial 4,0 les périthèces sont formés seulement quand le pH est remonté au-dessus de 6,0. Le remplacement de l'hydrolysât de caséine par le sulfate d'ammonium permet une bonne croissance mais l'acidification est telle que les périthèces ne se forment pas.

Les mêmes auteurs 1947 (3) en étudiant l'effet de la biotine sur Sordaria fimicola ont observé qu'avec un quantité limitante de biotine, le pH est encore trop acide après 12 jours pour que les périthèces puissent se former. Avec un excès de biotine au contraire, le pH remonte et les périthèces se forment. Pourtant, dans un milieu contenant de l'acétate où le pH s'élève précocement, les périthèces apparaissent tardivement s'il y a trop peu de biotine : ce n'est donc pas le pH qui commande la reproduction sexuée, mais l'épuisement des aliments en rapport avec la présence de biotine.

Effet de la température.

Nous allons analyser ici les quelques cas où l'on a démontré des différences entre les températures optimales pour la croissance et la sporulation.

BARNETT et LILLY 1950 (5) ont étudié l'effet de la température sur la production des têtes conidiennes et des sporanges chez Choanephora cucurbitarum. Ils ont montré qu'à 25°C les têtes conidiennes sont plus nombreuses que les sporanges; c'est l'inverse à 31°C. Il y a absence totale des spores à 34°C.

BASU et BOSE 1950 (8) ont démontré que la température optimale pour la sporulation de quelques espèces de Chaetomium est plus basse que pour la croissance.

Humidité, dessiccation.

On sait que la technique classique pour provoquer la formation des ascospores de levure consiste, après culture sur les milieux de pré-sporulation, à étaler les cellules sur un bloc de plâtre.

HARTELIUS et DITLEUSEN 1953 (24) ont proposé de remplacer le bloc de plâtre par un bloc d'un ciment convenable. Ainsi, chez les levures, la dessiccation est un facteur de sporulation.

Pour d'autres champignons, au contraire, HAWKER 1954 (28) a pu dire dans un rapport qu'il faut plus d'humidité pour la sporulation que pour la croissance.

Un cas intéressant est constitué par Choanephora cucurbitarum, Mucorale étudiée par LILLY et BARNETT 1950 (5): une humidité proche de la saturation favorise la formation des sporanges; tandis qu'une humidité plus faible favorise la formation des têtes conidiennes.

Aération.

Durant ces dernières années peu de travaux ont été consacrés au rôle de l'aération ou de l'asphyxie dans la sporulation des champignons.

BRETZLOFF 1951 (10), cultivant Sordaria fimicola, en milieu par barbotage d'air observe que le mycélium croît en petites colonies isolées. Les périthèces sont formés

sur la partie la plus récente du mycélium. Quelques uns de ces périthèces mûrissent et les ascospores sont libérées dans le milieu. Les périthèces submergés se forment aussi en milieu liquide stationnaire.

L'aérobiose stricte n'est donc pas nécessaire pour la formation des périthèces dans cette espèce.

Lumière. Obscurité.

BARNETT et LILLY 1950 (5) ont observé que les conidies ne se forment pas en pleine lumière continue, ni en obscurité totale continue chez Choanephora cucurbitarum. Une faible lumière continue entraîne au contraire^{la} formation des conidies.

TIMNICK, LILLY et BARNETT 1951 (53) ajoutent que l'obscurité continue est défavorable à la formation des périthèces chez Diaporthe phaseolorum var. batatatis.

L'effet des alternances d'obscurité et de lumière conduisent les auteurs à faire l'hypothèse d'un mécanisme de la sporulation qui comporterait deux réactions successives.

RICHARDS 1951 (46) travaillant sur Septoria nodorum obtient beaucoup de pycnides et de conidies avec une forte lumière. Sous une plus faible lumière, pycnides et conidies ne se forment qu'en petit nombre ou pas du tout.

La lumière visible n'est pas seule à pouvoir jouer un rôle dans la sporulation : ainsi DIENER 1952 (16) observe chez Stemphylium solani qu'une irradiation ultra-violette modérée entraîne une abondante sporulation.

M E T H O D E S E T T E C H N I Q U E S

A. ESPECES ET SOUCHES ETUDIEES :

Presque toutes nos expériences ont été faites à l'aide de la souche de Penicillium caseicolum Bainier ¹⁾ du Service des Fermentations de l'Institut Pasteur. Cette souche est utilisée pour la fabrication du fromage de Camembert.

Nous avons également fait quelques expériences avec P. chrysogenum Thom souche Wis Q-176.

¹⁾ Madame NICOT, Assistante au laboratoire de Cryptogamie du Muséum de Paris, a eu l'amabilité d'identifier la souche de Penicillium que nous avons utilisée. Nous tenons à l'en remercier vivement.

B. CONSERVATION DES SOUCHES

Nous entretenons les souches sur bouillon de haricots blancs additionné de saccharose à 2%, et gélosé; le pH est amené à 5,5 par addition d'acide tartrique.

Pour éviter les repiquages successifs, nous avons essayé de garder à la glacière un stock de conidies en suspension dans une solution à 0,5% d'agent mouillant (polyéthylène glycol estérifié par les acides gras de la fève de soja¹⁾) mais après six mois nous n'avons plus retrouvé de conidies viables.

Nous avons donc procédé aux ensemencements avec les conidies formées sur le milieu gélosé de conservation après 14 jours d'incubation à 24°.

1) Ce produit est commercialisé sous la désignation de "Neutronyx 30".

C. MILIEUX CHIMIQUEMENT DEFINIS.

Nous donnons ci-après la composition d'un milieu chimiquement défini qui nous a servi fréquemment de témoin dans nos expériences. Les variations que nous lui avons fait subir seront indiquées dans la partie expérimentale.

Nous nous sommes inspiré pour la composition saline de celle du milieu de Jarvis et Johnson (31) avec le glucose comme seule source de carbone, le nitrate comme seule source azotée. (Tableau 1).

Le pH initial des milieux n'a pas été ajusté à chaque expérience, mais résulte de l'emploi de solutions de phosphate faites une fois pour toutes. (Tableau 2).

TABLEAU 1: MILIEU SYNTHETIQUE TEMOIN

CONSTITUANTS dans l'eau distillée	g/l	mM
Glucose anhydre	45,0	250
NO_3K	10,0	100
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	6,8	50
SO_4NA_2	0,71	5,0
$\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$	0,246	1,0
$\text{SO}_4\text{Zn}, 7\text{H}_2\text{O}$	0,0287	0,1
$\text{SO}_4\text{Mn}, 4\text{H}_2\text{O}$	0,0223	0,1
$(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$	0,1	0,25
$\text{SO}_4\text{Cu}, 4\text{H}_2\text{O}$	0,005	0,02
$\text{Cl}_2\text{Ca}, 4\text{H}_2\text{O}$	0,915	5,0
KOH	0,312	5,57
(pour pH 5,8 après stérilisation)		

TABEAU 2. Ajustement des milieux à divers pH initiaux.

Pour un volume final de 1 litre de milieu

chimiquement défini contenant 50 mM de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$:

pH après stérilisation	KOH, N ml	$\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$ ml
7,4	42,5	-
5,8	5,57	-
5,0	3,05	-
4,0	2,57	-
3,0	-	2,4

Nous avons utilisé les produits "purs pour analyse" du commerce sans les purifier davantage.

Les deux solutions des sels minéraux et du glucose sont stérilisées séparément, pour éviter la caramélisation du glucose. Le milieu devient trouble en raison des précipités de phosphates des différents cations.

Parmi les modifications que nous avons apportées au milieu dont nous venons de donner la composition habituelle, nous signalons : l'addition de l'hydrolysate de caséine "privé de vitamines" préparé selon Clegg, Kodicek et Mistry, 1952. (15), et l'addition des solutions de sulfate d'ammonium et de pyruvate de soude, stérilisées par filtration sur bougie.

D. CONDITIONS D'ENSEMENCEMENT ET DE CULTURE

Toutes les cultures ont été effectuées à la température de 24° en milieux liquides aérés par agitation: on a utilisé en général des flacons d'Erlenmeyer de 1 litre contenant 100 ml de milieu ; les flacons sont fixés sur un agitateur rotatif qui tourne à 240 tours par minute, avec une excentricité de 3,5 cm.

Sauf indication contraire, les milieux à comparer n'ont pas étéensemencés directement avec la suspension de conidies, mais avec une culture en milieu chimiquement défini, agitée pendant 2 jours sur l'agitateur rotatif, et désignée comme "inoculat".

Dans 100 ml du milieu de l'inoculat, on ensemence les conidies d'une culture de 14 jours sur gélose inclinée en tube de diamètre 22 mm, mises en suspension dans 10 ml de la solution à 0,5% d'agent mouillant "Neutronix 30".

Le milieu de l'inoculat contient 250 mM de glucose, et 20 mM de NO_3K , à pH initial 4,0. Dans les expériences où l'effet d'un cation est étudié, la composition saline du milieu de l'inoculat est modifiée par réduction de la concentration du cation en question.

Après 2 jours de culture de l'inoculat, les conidies sont germées, un mycélium végétatif abondant s'est développé. On ensemence alors les flacons de l'expérience proprement dite, avec 5 ml d'inoculat pour 100 ml de milieu.

Les cultures définitives sont poursuivies 4 jours au moins; des prélèvements sont faits tous les jours.

E. TECHNIQUES MICROSCOPIQUES

1. Examen direct.

Chaque jour, nous avons prélevé une goutte du milieu de culture et l'avons observée entre lame et lamelle au grossissement moyen, pour apprécier le degré de sporulation.

2. Numération des conidies en fin de culture.

La numération des conidies dans les cultures en profondeur, présente des difficultés, car il est difficile de détacher les conidies des conidiophores où elles se sont formées et des hyphes au milieu desquels elles restent emprisonnées.

Pour y parvenir, on passe la culture dans un "émulsionneur" réglé à mi-vitesse pendant 30 secondes. Les hyphes sont fragmentés et les conidies libérées.

La culture ainsi homogénéisée est diluée avec de l'eau distillée. Une goutte de la culture diluée est utilisée pour faire le compte des conidies à la cellule de Mallasez.

F. TECHNIQUES CHIMIQUES

1. Mesure du pH

Nous avons mesuré le pH de nos milieux de culture avec une électrode de verre et un appareil "pH mètre", à lecture directe, permettant d'estimer le pH à 0,05 unité près.

2. Dosage du glucose

Nous avons utilisé la méthode cuproiodométrique de SOMOGYI, 1952 (49).

3. Recherche qualitative du nitrate

On décèle la présence de nitrate en ajoutant à 1 ml de culture, 1 ml d'acide sulfurique concentré et 1 ml de sulfate de brucine à 1%. Une coloration rose transitoire, puis jaune indique la présence du nitrate.

4. Recherche qualitative du nitrite

La présence de nitrite dans les milieux de cultures est mise en évidence par la réaction de Griess.

5. Recherche qualitative des acides aminés

a) par la réaction à la ninhydrine sur plaque à godets.

b) parchromatographie sur papier, dans les milieux de cultures, selon la technique de PROOM et WOIWOD 1949 (44).

6. Dosage titrimétrique d'acides organiques

Cette méthode sera décrite plus loin dans le chapitre correspondant.

7. Mesure du poids sec après centrifugation

Il est difficile de séparer le mycélium du milieu de culture par centrifugation, car le mycélium ne se colmate pas en culot.

Pour parer à cet inconvénient, nous ajoutons à un volume de culture, un volume égal du mélange :

455 ml d'alcool absolu

40 ml de CI H normal

5 ml de teepol

Le rôle du CI H présent dans le mélange de centrifugation est de dissoudre les précipités de phosphates qui se trouvent dans le milieu de culture.

L'alcool absolu ayant une densité moindre que l'eau distillée, permet à la moisissure de sédimenter et de former un culot.

Le teepol permet, en tant qu'"agent mouillant", d'éliminer les bulles d'air qui s'accumulent sur les hyphes. Ainsi les hyphes peuvent s'agglomérer pour constituer le culot.

On pourrait craindre que le mélange de centrifugation ne fasse passer en solution le contenu cytoplasmique des moisissures.

L'examen microscopique nous a prouvé que l'aspect morphologique du cytoplasme n'est en rien modifié.

La culture additionnée de ce mélange est centrifugée durant 15 min. à 3.600 tours/min.

Nous centrifugeons une second fois, le culot additionné d'un volume du même mélange dilué au 1/4.

On sèche le culot à l'étuve à 105°C. jusqu'à ce que le poids de la matière sèche soit constant.

8. Azote total

Le dosage d'azote total est fait sur le mycélium sec, selon la méthode de Kjeldahl.

Nous avons suivi le protocole décrit par P. Grabar dans "Techniques de Laboratoire" (36).

R E S U L T A T S E X P E R I M E N T A U X

I. EXPERIENCES AVEC PENICILLIUM CASEICOLUM BAINIER.

1. Effet du pH initial du milieu.

Pour l'étude du déterminisme de la formation des fructifications, nous avons cherché dès le début un milieu où la croissance se poursuive sans fructifications et un autre milieu où les fructifications se forment.

A la suite de diverses expériences préliminaires, nous avons obtenu des résultats en faisant varier le pH initial des cultures. Nous commencerons donc par décrire une expérience de ce type. (Tableau 3).

Nous avons ajouté au milieu témoin précédemment décrit, des quantités d'acide sulfurique telles qu'une gamme de pH entre 2,2 et 5,4 soit réalisée après ensemencement avec l'inoculat végétatif.

La culture N° 1 à pH initial 2,2 croît d'abord très lentement. Ce n'est qu'au 4-e jour que le pH s'élève à 5,5 et qu'une partie importante du glucose est utilisée.

Au contraire, avec les cultures N° 2 et 3 où le pH initial est de 3,0 et 3,5, on observe une croissance rapide qui conduit à l'épuisement quasi total du glucose au 4e jour.

Avec les cultures N° 4-5-6-7 de pH initial égal ou supérieur à 4,2, la croissance commence aussi rapidement, puis paraît se ralentir; il reste encore au 4e jour environ 20 g/l de glucose inutilisé sur 45 g/l.

Au 4^e jour, on retrouve en azote mycélien 32 à 63 m.équivalent/litre. D'autre part, dans le surnageant, on ne met en évidence ni azote nitreux, ni azote ammoniacal. Puisque le milieu synthétique contient 100 mM de nitrate par litre, il reste donc un excès d'azote non utilisé dans le milieu qu'on met en évidence qualitativement par le réactif à la brucine.

L'utilisation graduelle du nitrate comme source d'azote libère des cations K qui alcalinisent le milieu.

On observe qu'au bout de 2 jours les pH se sont égalisés aux environs de 6,0 dans les cultures N° 2 à 7; au 7^e jour le pH atteint 7,7.

Malgré cette égalisation des pH, l'examen microscopique révèle de grandes différences dans l'évolution des cultures selon le pH initial.

Dans les cultures dont le pH initial est à 3,5 ou au dessous, il y a souvent absence totale des fructifications jusqu'au 4^e jour; parfois cependant quelques conidiophores comportant peu de stérigmates et formant peu de conidies, apparaissent au 3^e ou 4^e jour.

Dans les cultures dont le pH initial est à 4,2 ou

TABLEAU 3.

MILIEU	EXAMEN	DUREE DES CULTURES (JOURS)				
		0	1	2	3	4
1	pH	2,2	2,5	2,6	2,6	5,5
	P	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
	gluc.	42,8		42,6		34,4
2	pH	3,0	3,0	5,5	6,6	7,0
	P	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
	gluc.	42,8		36,4		4,40
3	pH	3,5	3,9	6,2	6,7	6,7
	P	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
	gluc.	43,6		31,6		3,2
4	pH	4,2	5,5	6,1	6,5	7,1
	P	-	-	(+)	+	++
	C	-	-	-	-	(+)
	gluc.	40,4		36,0		16,4
5	pH	5,0	5,6	5,9	6,4	6,8
	P	-	-	++	+++	+++
	C	-	-	+	+	++
	gluc.	41,2		36,8		24,8
6	pH	5,2	5,8	6,0	6,5	6,9
	P	-	-	++++	++++	++++
	C	-	-	+	++	+++
	gluc.	44,8		36,8		21,2
7	pH	5,4	6,0	6,2	6,6	6,8
	P	-	-	++++	++++	++++
	C	-	-	+	+++	++++
	gluc.	44,0		36,8		17,2

ROLE DU pH INITIAL ENTRE 2,2 et 5,4.

P=conidiophores (pinces), C=conidies libres, gluc=glucose en g. restant dans le milieu.

La signification des - et des + résulte des cas extrêmes suivant

-: on ne trouve pas de conidiophores ou de conidies.

(+): il faut regarder de nombreux champs au grossissement x180 pour trouver un conidiophore ou une conidie libre.

++++: on trouve un très grand nombre de conidiophores ou de conidies dans un même champ (voir par exemple Fig.1 - B).



A.



B.

FIGURE 1.: Cultures de trois jours de Penicillium caseicolum.
Ensemencement massif avec un inoculat végétatif.

A.	pH initial 3,2	pH au 3e jour 7,4	Rares conidiophores
B.	pH initial 5,0	pH au 3e jour 6,6	Conidiophores et conidies.

Grossissement : x 180

au dessus, les fructifications apparaissent dès le 2^e jour; les jours suivants elles deviennent très nombreuses, très fournies, et libèrent beaucoup de conidies.

Les photomicrographies (Fig. I) permettent la comparaison entre les 2 types de cultures au 3^e jour, dans des milieux ensemencés avec un inoculat végétatif.

D'autre part des numérations de conidies faites au 4^e jour sur les cultures homogénéisées mécaniquement, ont donné les résultats suivants :

culture à pH initial 4,2 : 1.670.000 conidies/ml

culture à pH initial 5,4 : 14.500.000 conidies/ml

Le problème se trouve donc posé de savoir comment le pH initial des milieux peut exercer un tel effet sur la formation ultérieure des fructifications.

2. EFFET DE L'ÉPUISEMENT DU GLUCOSE DANS LE MILIEU.

Nous avons constaté qu'en présence d'un excès de glucose, les fructifications peuvent se former ou non en fonction du pH initial.

Nous avons pourtant tenu à voir quel effet peut exercer l'épuisement d'une quantité limitante de glucose.

En effet, différents auteurs ont observé avec plusieurs espèces ou souches d'Aspergillacées un rôle de l'aliment carboné dans la formation des fructifications.

A deux milieux témoins, contenant 250 mM de glucose, aux pH initiaux 5,0 et 3,5, nous avons donc comparé deux milieux, contenant seulement environ 25 mM de glucose, aux mêmes pH initiaux (Tableau 4: milieux n° 1, 2, 3 et 4).

Dans le milieu n°1 témoin, à pH initial 3,5, nous avons observé de rares fructifications et quelques conidies le 4^e jour. Dans le milieu n°3, bien qu'il reste encore une

trace de glucose au 2^e jour, on voit déjà apparaître quelques fructifications incomplètes, avec peu de branches et de conidies terminales; au 4^e jour, ces fructifications ont disparu, mais l'on retrouve d'assez nombreuses conidies libres.

Il est donc possible que l'épuisement d'une quantité limitante de glucose, et l'arrêt de la culture qui en résulte, ait pour effet d'entraîner la formation de quelques fructifications dans le milieu à pH initial 3,5.

Quant aux milieux à pH initial 5,0, l'épuisement de glucose, dans le milieu N°4 a pour effet d'entraîner au 4^e jour la disparition des nombreuses fructifications formées antérieurement, avec libération de nombreuses conidies.

En bref, et malgré ces quelques nuances, on peut dire que si l'épuisement du glucose ne provoque pas la formation massive de fructifications dans le milieu à pH initial bas, il n'inhibe pas non plus la libération de nombreuses conidies dans le milieu à pH initial plus élevé.

3. EFFET DE L'ÉPUISEMENT DU NITRATE DANS LE MILIEU.

Nous avons également comparé aux deux milieux témoins, contenant 100 mM de NO_3K , deux milieux contenant seulement 10 mM de NO_3K en vue d'étudier les effets de l'appauvrissement de la source azotée (Tableau 4 : milieux N°1 et 2, 5 et 6).

La recherche qualitative du nitrate (par la brucine) indique sa présence jusqu'au 4^e jour dans les milieux témoins N°1 et 2 et sa disparition dès le 2^e jour dans les milieux 5 et 6.

L'utilisation du glucose dans les deux cultures pauvres en nitrate est lente, et il en reste environ 30 g/l sur 45 g/l.

TABLEAU 4 : EFFET DE LA PENURIE DU GLUCOSE ET DU
NITRATE AUX 2 pH INITIAUX DIFFERENTS

MILIEU	GLU- COSE mM	NI- TRATE mM	EXAMEN	DUREE DE CULTURES (JOURS)				POIDS SEC mg/ml 5 jours
				0	1	2	4	
1	250	100	pH	3,5	5,6	6,7	7,2	15,1
			P	-	-	-	(+)	
			C	-	-	-	(+)	
			gluc.	42,0		32,0	3,40	
2	250	100	pH	5,0	5,9	6,4	7,1	10,7
			P	-	+	+++	+++	
			C	-	(+)	++	++++	
			gluc.	42,0		38,4	16,2	
3	25	100	pH	3,5	5,7	6,0	6,5	1,53
			P	-	-	(+)	-	
			C	-	-	(+)	+++	
			gluc.	4,5		0,38	0,0	
4	25	100	pH	5,1	5,8	6,0	6,2	1,91
			P	-	++	++++	-	
			C	-		++	++++	
			gluc.	4,5		0,0	0,0	
5	250	10	pH	3,5	5,7	5,5	5,5	4,94
			P	-	-	-	++	
			C	-	-	-	(++)	
			gluc.	37,2		38,4	30,0	
6	250	10	pH	5,1	5,8	5,8	5,9	4,05
			P	-	++	+++	+++	
			C	-	(+)	++	+++	
			gluc.	40,0		38,8	30,4	

L'épuisement d'une quantité limitée (10mM) de NO_3K n'empêche pas la formation des fructifications et ne le favorise pas non plus.

4. EFFET DE L'AMMONIAQUE A DIVERS pH :

Dans les expériences précédentes, le nitrate est la seule source azotée. Il convient de rechercher maintenant si l'ammoniaque, substituée ou additionnée au nitrate, ne change pas les résultats.

Mais nous devons aussi tenir compte de l'évolution du pH au cours des cultures : avec le nitrate nous constatons une montée progressive du pH par suite de l'assimilation de l'anion; avec le sulfate d'ammonium nous prévoyons une chute progressive du pH par suite de l'assimilation du cation.

En utilisant la courbe du titrage potentiométrique du milieu synthétique (contenant 50 mM de phosphate), nous calculons que 45 milliequivalents d'acide fort abaissent le pH de 7,4 à 3,2 et que 5,5 milliequivalents abaissent le pH de 4,8 à 3,2.

$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ est donc ajouté à raison de 22,5 mM au milieu à pH initial 7,4, et à raison de 2,75 mM au milieu à pH initial 4,8.

Dans les expériences où l'ammoniaque doit être la seule source azotée, nous ne pouvons utiliser pour l'inoculat le milieu habituel qui contient 20 mM de nitrate.

Nous avons donc essayé diverses formules d'inoculat et nous avons trouvé que le changement d'inoculat ne modifie pas les résultats précédemment acquis.

Nous avons alors choisi de préparer l'inoculat dans le milieu contenant : $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$: 22,5 mM à pH initial 7,4.

Avec l'inoculat de 2 jours, nous avons ensemencé des milieux contenant NO_3K et $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en combinaisons variées à divers pH.

Dans le milieu $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$: 22,5 mM à pH initial 7,0 où l'ammoniaque est le seul aliment azoté, et qui est identique à l'inoculat, conidiophores et conidies libres apparaissent au 2e jour, alors que le pH est à 6,2; elles sont très nombreuses les jours suivants, alors que le pH s'est abaissé à 3,5.

Dans le milieu contenant à la fois NO_3K : 100 mM et $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 22,5 mM à pH initial 7,0, la culture se développe presque parallèlement à la précédente : l'assimilation de l'ammoniaque entraîne la chute du pH qui atteint 3,3 au 4e jour; quelques conidiophores sont visibles au 1er jour, mais ne sont nombreux qu'au 2e jour.

Dans le milieu NO_3K 100 mM à pH initial 7,0, l'assimilation du nitrate se fait très mal ou pas du tout, par suite du pH élevé; la culture ne se développe pas, le pH reste stationnaire, le glucose est peu métabolisé. - Pourtant ce mycelium qui ne peut croître, forme dès le 1er jour des conidiophores qui libèrent des conidies les jours suivants.

Enfin dans le milieu $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$: 2,75 mM à pH initial 4,8, l'acidification se produit rapidement car l'effet tampon du phosphate est peu marqué à ce pH initial bas; après 1 jour le pH est à 3,3, ce qui correspond à peu près à l'épuisement de l'ammoniaque. Pourtant des conidiophores apparaissant au 1er jour. - Les jours suivants, la métabolisation du glucose se poursuit lentement; les conidiophores ne libèrent pas de conidies.

Au 5e jour on ajoute du nitrate de sorte que sa concen-

tration soit d'environ 100 mM; le lendemain on observe de nombreuses conidies libres.

De ces expériences nous tirons les conclusions suivantes :

1. Le nitrate paraît inassimilable à un pH élevé, de l'ordre de 7,0. Si le milieu contient à la fois nitrate et ammoniacal, le milieu s'acidifie par suite de l'assimilation préférentielle de l'ammoniacal.

2. Que ce soit en présence de nitrate seul, d'ammoniacal seule ou des deux à la fois, des conidiophores et des conidies apparaissent lorsque le pH initial est supérieur à 4,5.

La formation des conidiophores n'est donc pas en relation avec la présence ou l'absence du nitrate ou de l'ammoniacal.

Le seul déterminisme que nous avons mis en évidence jusqu'ici est donc celui qui résulte du pH initial du milieu.

5. EFFETS DE LA CONCENTRATION DE DIVERS CATIONS.

Les expériences précédentes ont établi qu'en fonction du pH initial du milieu témoin, il se forme ou il ne se forme pas de conidiophores.

En réduisant ou en augmentant la concentration d'un cation dans la formule du milieu témoin, il nous est donc possible de chercher si les conidiophores apparaissent là où ils ne se formaient pas, ou au contraire s'ils n'apparaissent plus là où ils se formaient.

a) Le calcium :

Le milieu témoin contient 1 mM de CaCl_2 . Nous avons supprimé le calcium dans la formule du milieu; nous avons d'autre part essayé 10 mM.

On n'observe pas de différences dans la croissance des cultures. A pH initial 3,0 dans les trois cas, il ne se forme pas de conidiophores. A pH initial 5,0, la suppression du

calcium dans la formule du milieu entraîne l'absence des conidiophores; ceux-ci se forment dans le milieu contenant 1 mM, et en plus grand nombre dans le milieu contenant 10 mM.

Une concentration élevée de calcium est donc nécessaire à la formation des conidiophores et des conidies.

b) Le cuivre :

Le milieu témoin contient 0,02 mM de SO_4Cu . Nous avons d'une part supprimé le cuivre dans la formule du milieu; nous l'avons d'autre part ajouté à une concentration dix fois plus forte, 0,2 mM.

À pH 5,8, dans les trois cas, la croissance des cultures est du même ordre et les conidiophores se forment. Nous avons seulement observé que les conidies, hyalines dans le milieu témoin, brunissent dans le milieu qui contient 0,2 mM de SO_4Cu .

Nous aurions donc pu sans inconvénients supprimer le cuivre dans la formule du milieu témoin, les impuretés en apportant suffisamment pour la croissance et la sporulation.

c) Le fer :

La suppression du fer dans la formule du milieu, à pH 3,0 ou 5,0, n'a pas diminué sensiblement la croissance : il y a donc eu assez de fer apporté par les impuretés. Mais on observe que la taille des éléments mycéliens est plus petite, ce qui prouve que la pénurie de fer est réelle.

À pH 3,0, dans tout les cas, il ne se forme pas de conidiophores.

À pH 5,0, dans le milieu où l'on n'a pas mis de fer, la formation des conidiophores n'est pas empêchée; au contraire ils apparaissent précocement dès le premier jour; les jours suivants, ils sont plus nombreux que dans le milieu témoin.

Ainsi la pénurie de fer paraît favoriser la formation des conidiophores dans le milieu à pH 5,0.

d) Le magnésium :

Le milieu témoin contient 1 mM de SO_4Mg .

La suppression du magnésium dans la formule du milieu empêche la croissance: le pH initial reste inchangé, et le glucose n'est pas utilisé. Le mycelium végétatif apporté avec l'inoculat ne forme pas de conidiophores, aussi bien à pH initial 3,0 qu'à pH initial 5,0.

Avec 10 mM de SO_4Mg , la croissance et la sporulation sont analogues à ce qu'elles sont dans le milieu témoin.

e) Le manganèse :

Le milieu témoin contient 0,1 mM de SO_4Mn .

Quand on supprime le manganèse dans la formule du milieu, on n'observe pas de différences dans la croissance: les impuretés en apportent donc suffisamment.

A pH initial 3,0, il ne se forme pas de conidiophores.

A pH initial 5,0, la pénurie de manganèse se manifeste par une formation ralentie des conidiophores qui sont au 4e jour nettement moins nombreux que dans le milieu témoin.

f) Le zinc :

Le milieu témoin contient 1 mM de SO_4Zn .

La suppression du zinc dans la formule du milieu n'empêche pas la croissance de se produire; pourtant il y a pénurie du zinc, car on observe au 3e jour une acidification à pH 4,5, qui interrompt la croissance.

Dans le milieu à pH 5,0, cette pénurie de zinc n'a pas eu d'effet sur la formation des conidiophores, qui sont au 3e jour aussi nombreux que dans le milieu témoin ou dans le milieu contenant 10 mM de SO_4Zn .

g) Récapitulation des effets des cations :

Dans le milieu à pH initial 3,0, ni la pénurie, ni l'excès des cations essayés : Ca, Fe, Mg, Mn, et Zn, n'ont provoqué la formation des conidiophores.

Dans le milieu à pH initial 5,0, la formation des conidiophores exige la présence de calcium à une concentration certainement bien supérieure à celle qui est nécessaire pour la croissance; le magnésium aussi est nécessaire mais peut-être intervient-il seulement comme facteur limitant de la croissance; l'effet du manganèse est peu net, mais sa pénurie paraît ralentir la formation des conidiophores. Au contraire, celle-ci est favorisée par une pénurie de fer, assez modérée pour ne pas empêcher la croissance.

Enfin, nos expériences sur la pénurie ou l'excès du cuivre et du zinc n'ont pas mis en évidence d'effets favorables ou défavorables à la formation des conidiophores.

6. RECHERCHE DES ACIDES ORGANIQUES PRODUITS DANS LES MILIEUX DE CULTURE A DIVERS pH INITIAUX

Les expériences précédentes ont montré que les modifications apportées aux concentrations de divers constituants dans la formule du milieu témoin n'ont pas entraîné la formation de conidiophores dans le milieu à pH initial 3,0, ni entraîné la non-formation des conidiophores dans le milieu à pH initial 5,0.

Nous sommes donc conduits à rechercher un mécanisme de sporulation qui soit mis en place durant la période où le pH demeure voisin du pH initial.

Ce mécanisme pourrait être la production d'acides or-

ganiques : il est connu, par des travaux sur diverses espèces de Penicillium et surtout d'Aspergillus que cette production est d'autant plus forte que le pH est plus bas.

On peut faire donc l'hypothèse, que des acides organiques produits dans le milieu à pH initial 3,0, modifieraient l'aptitude des cations à être assimilés, soit par formation de précipités, soit au contraire par formation de complexes solubles.

Nous avons donc cherché si les acides organiques sont formés en quantités différentes dans les milieux à divers pH initiaux.

Pour cela, on compare les courbes de titrage potentiométrique, effectuées avec le milieu neuf et avec les filtrats de culture.

Un échantillon de 10 cm³ est amené à un pH supérieur à 5,0, puis acidifié progressivement avec HCl, N.

Après addition de chaque fraction, le pH est mesuré à 0,02 unité pH près, à l'électrode de verre, avec un potentiomètre enregistreur.

La courbe pour le milieu neuf (sans acides organiques) tombe rapidement entre un palier correspondant à l'effet tampon de phosphate au dessus de pH 5,0, et un palier correspondant à l'effet tampon de l'acide chlorhydrique au dessous de pH 3,3.

Dans les filtrats de culture on titre entre pH 5,0 et pH 3,3 une proportion définie des acides carboxyliques faibles dont le pK est à l'intérieur ou au voisinage de cet intervalle.

Nous supposons que pour différentes conditions de culture, les divers acides sont produits dans des rapports à peu près constants.

L'excès d'acide chlorhydrique nécessaire pour faire

passer le pH de 5,0 à 3,3, dans le filtrat de culture par rapport au milieu neuf, est grossièrement proportionnel à la concentration totale des acides carboxyliques produits dans la culture.

Dans une expérience, on prépare trois milieux de composition identique, sauf que l'on ajuste les pH initiaux à 3,0, 3,5 et 4,5 .

Au 2^e jour les pH ont remontés à 6,9 dans les trois cultures, mais les conidiophores n'apparaissent que dans la troisième.

Au 5^e jour, les pH sont à 7,6 - 7,9; les conidiophores ne sont toujours présents que dans la troisième culture, la seule où il reste encore un peu de glucose. Les courbes de titrage potentiométrique sont faites alors sur les filtrats des cultures. Elles indiquent pour l'acidité organique, exprimée en milliéquivalent d'acide par litre : (Fig 2)

10,8 dans la culture à pH initial 3,0

11,8 " " " " " 3,5

2,4 " " " " " 4,5

Ce résultat montre donc que les quantités d'acides organiques formés sont différentes dans les cultures à pH initiaux différents.

Ces quantités sont plus élevées à pH bas, dans les cultures où ne se forment pas de conidiophores. Mais il s'agit de savoir si ces deux phénomènes sont indépendants ou liés l'un à l'autre.

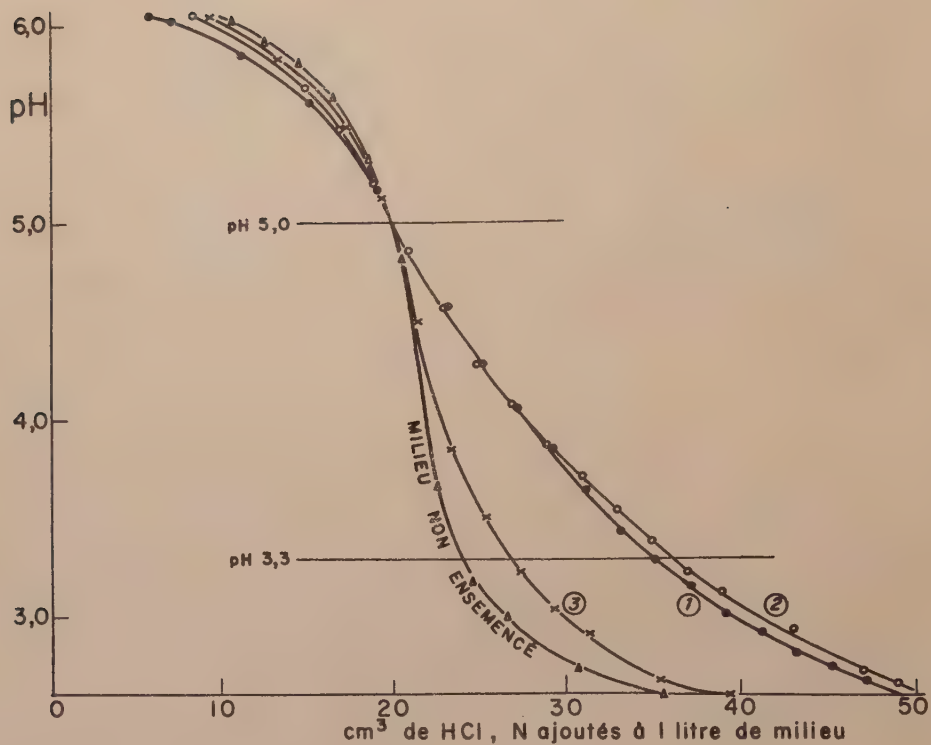


FIGURE 2. Recherche des acides organiques produits dans les milieux de culture à divers pH initiaux.

Les courbes de titrage sont faites sur les filtrats des cultures le 5e jour.

- (1) = filtrat de culture à pH initial 3,0
- (2) = " " " " " 3,5
- (3) = " " " " " 4,5

7. EFFET DE L'ADDITION D'ACIDES ORGANIQUES SUR LA CROISSANCE ET LA FORMATION DES CONIDIOPHORES.

Parmi les acides organiques produits par Penicillium dans un milieu à pH initial bas, on peut penser à l'acide citrique et à l'acide oxalique.

Nous avons donc cherché si l'un ou l'autre de ces acides peut, par sa présence, empêcher la formation des conidiophores.

Au milieu à pH initial 5,0 ou supérieur à 5,0, dans lequel nous savons que se forment des conidiophores, nous ajoutons donc dès le départ des concentrations variables de citrats de sodium ou d'oxalate de potassium.

a) Effet du citrate de sodium.

Le citrate de sodium a été ajouté aux concentrations de 5 mM, 25 mM et 125 mM.

Les concentrations les plus fortes de citrate ralentissent la croissance, retardent du 2^e au 3^e jour l'apparition des conidiophores, et diminuent beaucoup ^{le} nombre de conidies libérées au 4^e jour et la masse de matière sèche formée au 5^e jour.

Mais aucune des concentrations essayées, même la plus forte, n'empêche totalement la sporulation du champignon.

b) Effet de l'oxalate de potassium.

La présence d'oxalate de potassium jusqu'à la concentration de 25 mM n'empêche pas les conidiophores d'apparaître normalement dans le milieu à pH initial 5,0 au 2^e jour de la culture.

Ces résultats négatifs obtenus avec l'acide citrique

et l'acide oxalique, rendent peu vraisemblable l'hypothèse selon laquelle l'accumulation des acides organiques produits par le champignon à pH bas, pourrait expliquer qu'il ne se forme pas de conidiophores dans la culture à pH initial 3,0 .

8. EFFET DE L'ADDITION D'AGENTS COMPLEXANTS.

Pour compléter les essais précédents effectués avec l'acide citrique et l'acide oxalique nous avons étudié les effets de trois "agents complexants" qui ont pour propriété de former avec divers cations des précipités ou des complexes solubles.

a) L'acide éthylène diamine tétraacétique (Complexon III) ajouté aux concentrations de 0,2 et 2 g/l au milieu à pH initial 5,0, n'a d'effet ni sur la croissance ni sur l'utilisation du glucose, ni sur l'évolution du pH; il n'empêche pas la formation des conidiophores.

b) La 8-hydroxy-quinoline (en solution dans l'alcool absolu) aux concentrations de 0,01 et 0,1 mM empêche le mycelium de croître et de former des conidiophores dans le milieu à pH initial 5,0.

c) L'ortho-phenanthroline, à 0,1 mM n'a pas d'effet sur la croissance, mais diminue un peu la formation des conidiophores et la libération des conidies. A la concentration de 1 mM, l'ortho-phenanthroline empêche la croissance et la formation des conidiophores.

Par quelques expériences faites avec les agents complexants, nous n'avons donc pas pu mettre en évidence de concentration qui soient complètement inhibitrices pour la formation des conidiophores, sans l'être aussi pour la croissance.

9. CENTRIFUGATION DES CULTURES ET ECHANGE CULOTS-SURNAGEANTS.

Nous nous sommes demandé si le système qui entraîne la formation des conidiophores dans le milieu à pH initial 5,0, est présent dans le milieu de culture, ou dans le mycelium lui-même.

Le milieu d'inoculation préalable (à pH initial 4,0) agité pendant 2 jours est utilisé pour ensemencement de 4 flacons dont 2 contiennent des milieux de culture à pH initial 3,0 et deux autres des milieux de cultures à pH initial 5,0.

Après 24 heures d'agitation, les pH se sont égalisés et atteignent 5,7. Les cultures sont alors centrifugées à froid, et les culots lavés deux fois avec un tampon de phosphate 50 mM à pH 5,0. Nous obtenons deux culots C_3 et C_5 et deux surnageants S_3 et S_5 , provenant des cultures ayant respectivement un pH initial de 3,0 et un pH initial de 5,0.

Une moitié du culot C_3 est ajoutée à 100 ml du surnageant S_5 . L'autre moitié du culot C_3 est ajoutée à 100 ml de milieu neuf M_5 à pH initial 5,0.

Nous procédons de la même manière avec le culot C_5 . Une moitié de ce culot est ajoutée à 100 ml de surnageant S_3 , tandis que l'autre moitié est ajoutée à 100 ml de milieu neuf.

Les 4 flacons sont alors remis à agiter pendant 4 jours supplémentaires.

Les cultures formées avec le culot C_3 remis en suspension dans S_5 ou M_5 donnent tardivement des conidiophores peu nombreux.

Au contraire, les cultures formées avec le culot C_5 remis en suspension dans S_3 , forment de nombreux conidiophores, dans les mêmes délais que la culture à pH initial 5,0, non centrifugée.

Ainsi le surnageant S_5 ne contient pas de facteur qui favorise la sporulation. Et le surnageant S_3 ne contient pas de facteur qui inhibe la sporulation.

C'est donc le mycelium lui-même qui est orienté vers la sporulation ou non, par la phase précoce de la croissance à un pH voisin du pH initial.

10. INHIBITION DE LA FORMATION DES CONIDIOPHORES EN PRESENCE D'UNE SOURCE D'AZOTE AMINE.

1) Dans une de nos premières expériences, nous avons remplacé dans la formule du milieu témoin, le nitrate par la peptone à 5 g/l; les échantillons de la culture à pH initial 5,8 ont été examinés pendant huit jours sans qu'apparaissent les conidiophores.

Il y a donc dans la peptone une ou plusieurs substances dont la présence empêche, ou tout au moins retarde beaucoup la sporulation du champignon.

2) Nous avons éliminé l'hypothèse selon laquelle une vitamine apportée par la peptone serait le facteur de l'effet observé, en remplaçant le nitrate par l'hydrolysât de caséine "privé de vitamines".

Lorsque l'hydrolysât de caséine n'apporte au milieu à pH initial 5,8 que 10 milliéquivalents d'azote, les conidiophores se forment presque normalement.

Mais avec 100 milliéquivalents d'azote, la culture, qui a été suivie jusqu'au 8e jour, ne sporule pas.

Nous avons alors cherché si un seul acide aminé à la concentration initiale de 50 mM, n'est pas capable d'empêcher la sporulation dans le milieu à pH initial 5,8.

Parmi les acides aminés de l'hydrolysate de caséine nous avons cherché l'effet de l'acide L-aspartique, de l'acide L-glutamique, et de la L-alanine.

3) Avec l'acide L-aspartique, on observe un temps de latence de plusieurs jours pendant lequel le mycelium apporté par l'ensemencement forme de nombreux conidiophores.

4) Avec l'acide L-glutamique, la croissance est plus rapide, et le poids sec formé au 7^e jour est le double de celui formé dans le milieu témoin avec nitrate. Des conidiophores se forment, en moins grand nombre toutefois que dans le milieu témoin.

5) Avec la L-alanine, le poids sec formé au 7^e jour est plus du double de celui formé dans le milieu témoin.

Dans cette culture bien développée on ne voit pas de conidiophores durant les 7 jours où la culture a été examinée.

6) Par chromatographie sur papier, nous avons recherché chaque jour les acides aminés dans les filtrats de culture.

Dans les milieux contenant aspartate ou glutamate, l'acide aminé n'est pas épuisé au 7^e jour, alors que les conidiophores sont présents.

Dans les milieux contenant 50 mM d'alanine, il a été trouvé au cours d'une expérience que l'alanine est épuisée entre le 4^e et le 5^e jour. Malgré cet épuisement de l'alanine en cours de culture les conidiophores ne se sont pas formés les jours suivants, bien que la métabolisation du glucose se soit poursuivie. Mais la culture avait alors atteint un pH de 4,2, trop bas pour la sporulation.

7) Nous avons essayé de remplacer l'alanine par l'acide cétonique correspondant en présence d'ammonium.

Dans un milieu à pH initial 5,8 contenant 50 mM de pyruvate de sodium, et 25 mM de sulfate d'ammonium, l'assimilation de l'ammoniaque entraîne la chute du pH qui atteint 3,0 au 6^e jour. Avant cette acidification, entre le 2^e et le 4^e jour, il se forme des conidiophores.

Ainsi le champignon qui est pourtant capable de croître en milieu ammoniacal, ne synthétise pas assez d'alanine en présence de pyruvate et d'ammonium, pour que la formation des conidiophores soit empêchée.

C'est donc bien la fonction aminée de l'alanine, et non son radical carboné qui exercent cet effet.

II. PASSAGES EN SERIE DANS DES MILIEUX DE CULTURES A pH 3,0 ou 5,0 EN ABSENCE OU EN PRESENCE D'ALANINE.

Nous avons eu notre attention attirée sur le fait, que, dans les expériences précédentes, les cultures en présence d'alanine d'une part, et les cultures en absence d'alanine à pH initial 3,0 d'autre part, sont plus rapides et plus abondantes que les cultures en absence d'alanine à pH initial 5,0 : dans ces dernières, la croissance paraît arrêtée par la formation des nombreux conidiophores.

Nous nous sommes demandé si les différences entre les cultures sur ces divers milieux n'iraient pas en ^{s'}accentuant au cours de passages successifs.

Nous avons réalisé les passages successifs en ensemençant de deux jours en deux jours, 100 ml de milieu avec 5 ml de la culture précédente : il suffit donc en deux jours de quatre à cinq doublements de la matière sèche pour rattraper l'effet de cet dilution au 1/20 réalisée par l'ensemencement.

Selon le protocole habituel, le premier passage est commun à toutes les séries : les conidies d'un tube de gélose sont ensemencées dans le milieu d'inoculation à pH initial 4,0.

Les passages ultérieurs sont faits pour chaque série dans des milieux ayant même pH initial et même composition.

1) Dans les milieux à pH initial 3,0, sans alanine, les cultures successives donnent après 5 jours des poids secs du même ordre :

2° passage	11,7	mg/ml
3° "	11,8	
4° "	12,7	
5° "	12,7	

Les conidiophores n'apparaissent pas dans les quatre premiers jours de la culture du 2° passage. Aux passages suivants il en apparaît quelques uns vers le 3° ou le 4° jour, mais toujours en nombre plus faible que dans les milieux à pH initial 5,0 que nous allons examiner maintenant.

2) Dans les milieux à pH initial 5,0, sans alanine, les cultures successives sont de plus en plus pauvres. Les poids secs après 5 jours expriment cet appauvrissement progressif des cultures :

2° passage	8,6	mg/ml
3° "	4,9	
4° "	2,9	

Après le 2° passage, le mycelium se fragmente en petites pelotes (pellets) des auteurs anglais) qui croissent très lentement. - Au microscope, on observe de très nombreux conidiphores et des conidies qui ne paraissent pas germer au cours des passages successifs.

3) Dans les milieux à pH initial 5,0, en présence de 50 mM d'alanine, la croissance se maintient abondante au cours des passages

successifs; les poids secs après 5 jours sont les suivants :

2° passage	20,8 mg/ml
3° "	20,3
4° "	19,1

Au second passage, on ne voit pas de conidiophores, sauf de très rares au 4° jour; mais aux passages suivants, ils se forment plus précocement, et le nombre des conidies libres augmente, sans être aussi grand que dans le milieu à pH initial 5,0, sans alanine.

Nous avons vérifié qu'il reste de l'alanine jusqu'au 4° jour; elle n'inhibe donc pas totalement la formation des conidiophores.

4) Pour contrôler les résultats précédents, nous avons essayé de "régénérer" la série à pH initial 5,0, en ensemençant avec la culture de 4 jours du 3° passage les trois milieux précédemment utilisés. Les cultures ont donné après 5 jours les poids secs suivants:

milieu à pH 3,0 sans alanine	15,9
milieu à pH 5,0 sans alanine	5,6
milieu à pH 5,0 avec alanine	9,2

Dans le milieu à pH initial 3,0, la culture repart très abondamment, sans formation de conidiophores.

Mais dans le milieu à pH initial 5,0, en présence d'alanine, le poids sec ne reprend pas les valeurs élevées que nous avons trouvées précédemment, ce qui doit être mis en relation avec la formation d'assez nombreux conidiophores.

En conclusion de ces expériences de passages en série, nous avons confirmation qu'une source d'azote aminé, telle que l'alanine, joue un rôle de facteur de croissance accessoire lorsque le milieu chimiquement défini à un pH initial de 5,0. Mais nous

espérons que la présence d'alanine suffirait à permettre indéfiniment une croissance végétative : en réalité, après quelques passages, il y a de plus en plus de conidiophores, dont la formation semble pouvoir être attribuée à l'insuffisante synthèse de quelque'autre facteur.

II. EXPERIENCES AVEC P. CHRYSOGRENUM THOM.

Le problème se pose de savoir si les résultats obtenus avec P.caseicolum Bainier peuvent être généralisés à d'autres souches ou espèces.

Nous avons consacré quelques expériences à étudier, dans diverses conditions de pH et de nutrition azotée, la formation des conidiophores de Penicillium chrysogenum (Thom) souche Wis.Q.-176:

Nous avons réalisé les cultures de la même manière qu'avec P.caseicolum.

Une suspension de conidies formées sur gélose, a servi à ensemercer le milieu chimiquement défini à pH initial 4,0; après agitation pendant 2 jours, la culture végétative ainsi développée est utilisée comme inoculat pour ensemercer à raison de 5 pour cent les 4 milieux dont la composition est indiquée dans le tableau 5.

1) CULTURES A DIVERS pH INITIAUX

Nous avons d'abord comparé la croissance de P.chrysogenum Q-176 dans deux milieux à pH initiaux différents, contenant glucose et NO_3K . (cultures n° 1 et 2).

A pH initial 5,0, dès le premier jour, les conidiophores sont formés; au 2° jour, les conidiophores sont en voie de désorganisation et les conidies sont libérées.

Il y a un léger retard dans la formation des conidiophores lorsque le pH initial est à 3,5. Mais au 3° et 4° jour, le nombre des conidies libres est du même ordre dans les deux types de cultures, qui sont tout à fait identiques: le glucose est épuisé; le pH est supérieur à 8,0; une teinte brunâtre s'est

développée.

Nous n'observons donc pas de différence nette selon les pH initiaux, entre les cultures de P.chrysogenum Q-176 et les cultures de P.caseicolum qui, comme nous l'avons vu, ne forment pas de conidiophores ou n'en forment que très tardivement dans les milieux à pH initial bas.

2) REMPLACEMENT DU NITRATE PAR LE SULFATS D'AMMONIAQUE

Lorsque nous avons remplacé le nitrate par le sulfate d'ammoniaque, nous avons également élevé le pH initial à 7,1, pour tenir compte de l'acidification ultérieure. (Tableau 5 culture n° 3).

Dans ces conditions, la culture se développe bien, et épuise le glucose au 4° jour. Sa teinte ne change pas et reste blanc verdâtre.

Malgré le pH bas, de 3,5 à 3,8, qui est rapidement atteint, on voit apparaître au 3° jour quelques conidiophores, et au 4° jour des pinceaux plus nombreux et des conidies libres.

Ainsi les conidiophores peuvent se former même à pH bas. La présence de NH_3 comme aliment azoté n'a pas empêché qu'ils se forment; bien que tardivement; toutefois nous n'avons pas vérifié si NH_4 (50 milliéquivalents) n'est pas épuisé au 3° jour lorsque les conidiophores apparaissent.

3) CULTURES DANS LE MILIEU DYNAMIQUEMENT TAMPONNE

DE JARVIS ET JOHNSON

JARVIS et JOHNSON 1947 (30) ont établi une formule de milieu synthétique favorable à la production de pénicilline par P.chrysogenum Q-176. Dans ce milieu, la source azotée est l'ammoniaque, mais l'acidification qui résulterait de l'assimilation de l'ammoniaque est évitée par la présence de quatre sources car-

TABLEAU 5.

COMPOSITION DES MILIEUX POUR P. CHRYSOGENUM WIS. Q-176

Les milieux ont la composition du milieu chimiquement défini témoin (Tableau 1) sauf les différences indiquées ci-dessous :

CONSTITUANTS mM	MILIEUX			
	1	2	3	4
NO_3K	100	100	-	-
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	-	-	25	-
acetats de NH_4	-	-	-	50
lactats de NH_4	-	-	-	50
glucose	250	250	250	50
lactose	-	-	-	100
pH (initial)	3,5	4,8	7,1	6,8

bonnées: les deux anions acétique et lactique, un sucre facile-assimilable, le glucose, et un sucre plus lentement assimilable, le lactose.

L'évolution du pH au cours de cultures submergées a permis de parler d'un milieu "dynamiquement tamponné".

Une culture sur ce milieu a été faite en comparaison avec les cultures précédentes (Tableau 5, culture n° 4).

Nous avons constaté que le pH reste au voisinage de la neutralité. Au 4^e jour il reste environ la moitié du sucre réducteur non utilisé dans le milieu. Cette culture prend la couleur dorée caractéristique d'une sécrétion de chrysogénine.

Mais les pinceaux sont très peu nombreux et n'apparaissent qu'au 3^e et 4^e jour, avec quelques conidies libres.

Ainsi la culture de P.chrysogenum Q-176 dans les conditions les plus favorables à la production de pénicilline, ne présente qu'une sporulation faible et tardive.

4) EFFET DE LA PRESENCE D'ALANINE.

Dans une autre expérience, nous avons ensemencé avec une culture bien développée deux milieux :

- l'un à pH 5,0 avec NO_3K , où les conidiophores se sont formés dès le 1^{er} jour comme nous le savons déjà.
- l'autre à pH 5,0, avec NO_3K et alanine 50 mM, où les conidies ne se sont pas formées avant le 4^e jour.

Nous confirmons donc avec P.chrysogenum Q-176 l'effet de l'alanine constaté avec P.caseicolum Bainier; l'alanine accélère la croissance et empêche plus ou moins longtemps la sporulation.

TABLEAU 6 : PENICILLIUM CHRYSOGENUM . WIS. Q-176

CULTURES AUX DIVERS pH INITIAUX

MILIEU	EXAMEN	DUREE DES CULTURES (JOURS)				
		0	1	2	3	4
1	pH	3,5	5,2	5,2	8,1	8,3
	P	-	-	++	-	-
	C	-	-	+++	+++	++
2	pH	4,8	5,6	7,4	8,2	8,4
	P	-	++	(+)	-	-
	C	-	-	+++	++	+++
3	pH	7,1	6,3	3,5	3,8	4,3
	P	-	-	-	+	++
	C	-	-	-	(+)	+
4	pH	6,5	6,2	6,8	7,6	7,3
	P	-	-	-	(+)	(+)
	C	-	-	-	+	+

LEGENDE: comme Tableau 3 (p.29).

D I S C U S S I O N

Dans l'historique nous avons passé en revue les travaux antérieurs où sont décrits les facteurs externes qui jouent un rôle dans la formation ou l'empêchement de la reproduction sexuée chez les champignons .

Dans ce chapitre nous discuterons nos résultats par rapport à ceux des auteurs précédents.

pH

Parmi tous les facteurs externes que nous avons étudiés pour la formation des conidiophores chez Penicillium caseicola, nous avons démontré que le pH initial du milieu de culture joue un rôle primordial.

Nous constatons que dans une culture dans un milieu à pH initial 3,0 il ne se forme que peu ou pas du tout de conidiophores, tandis qu'à pH initial 5,0 il s'en forme beaucoup.

Nous rappelons ici le travail de GILBERT et HICKEY (1946) (21) sur Penicillium notatum dans les cultures submergées, qui précisent que le pH permettant la sporulation est compris entre 5,0 et 6,5.

Cations

Nous avons trouvé pendant nos recherches sur P. caseicola que la présence du calcium dans le milieu favorise la formation des conidiophores. Cet effet est analogue à celui décrit par FOSTER, Mc DANIEL, WOODRUFF et STOKES 1945 (18) dans la sporulation de P. notatum. BUSTON et BASU 1948 (12) chez Chaetomium globosum ont aussi mis en évidence le rôle du calcium dans la formation des périthèces.

Le cuivre avec notre souche n'a pas d'effet inhibiteur sur la formation des conidiophores, mais nous avons noté un bru-

nisement des conidies, effet analogue à celui qu'a décrit MULDER 1938 (42) et qu'a confirmé PONGRATZ 1950 (43) .

Nous avons observé que le nombre de conidiophores chez notre souche augmente lorsque la concentration de fer diminue. Il y a une différence avec les résultats de GILBERT et HICKEY 1946 (21) sur P. notatum. Ils constatent qu'une quantité faible de fer entraîne la sporulation et qu'une quantité plus forte diminue la croissance et empêche la sporulation.

Les résultats que nous avons obtenus avec le manganèse confirment ceux que Gabriel BERTRAND en 1912 (9) avait obtenu chez A. niger : les conidiophores augmentent avec la quantité du manganèse présent dans le milieu. STOCKDALE a constaté le même effet en 1953 (51) chez Trichophyton persicolor.

En résumé, les cations ne jouent qu'un rôle secondaire par rapport au pH initial du milieu.

Agents complexants

Nous avons montré que la complexon III ou acide éthylène-diamine tétraacétique à concentration relativement élevée n'inhibe pas la croissance ou la formation des conidiophores chez P. casei-colum. Au contraire, HALL 1954 (22) a montré que cet agent complexant inhibe la croissance de Tetrahymena pyriformis : et SUSSMAN 1954 (52) a trouvé également un effet inhibiteur de la complexon chez Neurospora tetrasperma.

Nous avons constaté que la 8-hydroxy quinoline a complètement inhibé la croissance de notre souche, effet analogue à celui trouvé par ALBERT, GIBSON, RUBBO 1953 (1) chez les bactéries.

Effet de l'aliment carboné

Il nous est apparu dans l'historique que, vis-à-vis de l'aliment carboné, il pouvait y avoir pour la sporulation deux modalités :

- ou bien la sporulation se produit à la suite de l'épuisement de l'aliment carboné; c'est par exemple le cas de Choanephora cucurbitarum (5)

- ou bien la sporulation se produit alors que l'aliment carboné demeure en excès : tel est le cas de Memnoniella echinata (12).

La formation des conidies par Penicillium caseicolum correspond à ce second cas.

Il est probable aussi que P. notatum a sporulé en présence d'un excès de sucre, dans les expériences de FOSTER et coll. (18) dont le milieu synthétique contient 20 g/l de saccharose, et dans les expériences de GILBERT et HICKEY (21) dont le milieu complexe contient 30 g/l de glucose.

Effet du nitrate

De même, nous avons constaté la sporulation de P. caseicolum dans des milieux contenant 100 mM de nitrate, et nous avons vérifié que le nitrate demeure en excès lorsque les conidies se forment.

Il est vraisemblable qu'il en est de même dans le milieu synthétique de FOSTER et coll. (18) qui contient 70 mM de nitrate.

Pourtant, GILBERT et HICKEY (21) ont montré que l'addition de 35 mM de nitrate à un milieu contenant des produits naturels, augmente la croissance et diminue beaucoup la sporulation de Penicillium notatum NRRL 832. Cela paraît indiquer que la sporulation de cette souche est consécutive à une pénurie d'aliment azoté, qui peut être l'azote nitrique.

Il est vraisemblable que cette divergence avec nos résultats s'explique par des différences dans le métabolisme azoté des deux souches étudiées.

En somme, nous avons aperçu que ce n'est pas l'épuisement d'une source carbonée ou azotée qui provoque ou empêche la

formation des conidiophores chez P.caseicolum.

Source d'azote aminé

Nous avons remarqué qu'en présence d'une source d'azote aminé il y a croissance luxuriante chez Penicillium caseicolum, mais empêche la formation des conidiophores, notamment avec l'hydrolysât de caséine, l'alanine et, semble-t-il, quelques autres acides aminés.

Cela nous a conduit à faire l'hypothèse que les sources d'azote aminé soient des facteurs accessoires de croissance lorsque la culture se développe à un pH supérieur à 5,0.

Nous trouvons un exemple de l'influence du pH sur les besoins nutritifs d'un microorganisme dans un travail de HALL, TIWARI et WALKER 1952 (23) sur la bactérie Acetobacter-suboxydans:

dans le milieu glucosé, le besoin d'alanine passe d'essentiel à stimulant lorsque le pH passe de 5,0 à 5,3:

dans le milieu contenant du glycerol, c'est le besoin de valine qui n'est pas essentiel à pH 5,0 et qui l'est à pH 5,3:

enfin dans le milieu glucosé, l'acide nicotinique est essentiel à pH 5,0, mais non à pH 6,0;

Il est donc possible, que pour notre souche de Penicillium également, quelque métabolite jouant un rôle dans le métabolisme azoté soit synthétisé en abondance au pH bas, et en quantité limitante à pH plus élevé.

Il se pourrait par exemple que la vitamine B₆ dont on sait le rôle dans les réactions de transamination soit ce facteur accessoire. HOLDEN, FURMAN et SNELL 1949 (29) ont montré que Aspergillus niger contient en abondance la vitamine B₆ même quand il croît dans un milieu privé de vitamine.

Nous avons observé que la croissance chez P.caseicolum diminue par passages successifs à pH initial 5,0: nous avons éga-

lement remarqué que l'addition d'alanine au milieu à pH initial 5,0 permet des repiquages successifs. Cela constituerait un mécanisme expliquant l'effet des acides aminés, et en particulier celui de l'alanine, sur la croissance et la sporulation.

Disons enfin, que nous sommes d'accord avec BASU et BOSE 1950 (8) lorsqu'ils constatent, au cours de leur travail sur Chaetomium, qu'il n'existe pas de stade de maturité auquel le champignon devrait aboutir avant de fructifier.

Ainsi nous avons vu nous-même que les hyphes de P.casei-colum peuvent former des conidiophores dans le voisinage même de la conidie germée d'où ils sortent, si les conditions sont favorables à une sporulation immédiate.

C O N C L U S I O N S

Notre recherche a été consacrée à l'étude de la formation des conidies de diverses espèces et souches de champignons dans un milieu synthétique, à 24°C, agité pour assurer aération et homogénéité des cultures.

I. La majeure partie du travail a été effectuée sur P.casei-colum Bainier. Un milieu témoin chimiquement défini a été établi, contenant le glucose comme source carbonés et le nitrate comme source azotée.

Nous avons d'abord observé l'effet du pH initial sur le sort ultérieur des cultures : les conidiophores ne se forment pas à pH initial inférieur à 4,5, ou ne se forment que tardivement; à pH initial supérieur à 4,5, la formation des conidiophores est précoce et abondante.

Le facteur qui provoque la formation des conidiophores n'est ni l'épuisement du glucose, ni l'épuisement du nitrate.

Que l'aliment azoté soit le nitrate seul, le sulfate d'ammonium seul, ou les deux à la fois, des conidiophores^{se} forment lorsque le pH initial est supérieur à 4,5.

Le rôle de quelques cations a été étudié à divers pH initiaux:

Dans le milieu à pH initial 3,0, ni la pénurie, ni l'excès de Ca, Fe, Mg, Mn et Zn n'ont provoqué la formation des conidiophores.

Dans le milieu à pH initial 5,0, Ca est nécessaire à concentration élevée pour la formation des conidiophores: Mg aussi est nécessaire, mais peut-être intervient-il seulement comme facteur limitant de la croissance; Mn a un effet peu net, qui paraît favorable à la formation des conidiophores. Au contraire celle-ci est favorisée par une pénurie de Fe. Nous n'avons pas mis en évidence d'effets favorables d'une pénurie ou d'un excès de Cu ou de Zn.

La quantité d'acides organiques formés dans le milieu de culture varie selon le pH initial du milieu. Elle est un plus grande à pH initial 3,0, qu'à pH initial 4,5. Mais l'addition d'acide citrique ou d'acide oxalique aux milieux n'empêche pas la formation des conidiophores.

Parmi les "agents complexants" l'acide éthylène diamine tétra acétique (Complexon III) à 2 g/l et l'ortho-phé-
nantroline à 0,1 mM n'ont d'effet ni sur la croissance, ni sur la formation des conidiophores; la 8-hydroxyquinoline à 0,01 mM inhibe complètement la croissance.

Une expérience de séparation et de recombinaison du mycelium et du milieu surnageant de jeunes cultures montre que l'aptitude à sporuler est liée au mycelium et non pas induite par le milieu surnageant.

Nous avons constaté qu'en présence de diverses sources d'azote aminé comme la peptone, l'hydrolysate de caséine ou l'alanine la production des conidiophores à pH initial 5,8 est empêchée ou très retardée.

Le pyruvate en présence d'ammoniaque n'exerce pas le même effet que l'alanine.

Les repiquages en série dans les milieux contenant du glucose et du nitrate sont possibles à pH initial 3,0, mais non à pH initial 5,0. Cela suggère qu'à pH initial bas la souche peut faire la synthèse de tous ses métabolites tandis qu'elle ne le peut à pH initial plus élevé.

L'addition d'alanine au milieu à pH initial 5,0, donne une abondante croissance végétative, qui permet des repiquages en série.

II. Quelques expériences avec Penicillium chrysogenum Thom, souche Wis Q-176 montrent que, avec cette souche, les repiquages sont possibles dans le milieu synthétique contenant glucose et nitrate, à pH initial 5,0 comme à pH initial 3,0.

De nombreux conidiophores se forment précocement dans l'un et dans l'autre milieu.

Le remplacement du nitrate par l'ammoniaque n'empêche pas la formation des conidiophores, qui se poursuit après l'acidification de la culture.

Dans un milieu dynamiquement tamponné, contenant glucose, lactose, acetate et lactate, les conidiophores sont très peu nombreux et n'apparaissent que tardivement.

De même la présence d'alanine, qui favorise la croissance, retarde l'apparition des conidies.

Ainsi, la comparaison des deux souches étudiées de P. chrysogenum et de P. caseicolum montre des différences entre elles vis-

à-vis de l'effet des pH initiaux des milieux. Mais dans les deux cas, la présence d'alanine, en permettant une croissance plus rapide, retarde ou empêche la formation des conidiophores.

B I B L I O G R A P H I E.

1. ALBERT, A., GIBSON, M. I. et RUBBO, S. D. - The influence of chemical constitution on antibacterial activity. VI. The bacterial action of 8-hydroxyquinoline (oxine). Brit. J. exp. Pathol. 1953, 34, 119-30.
2. ARIMA, K., TANAKA K. et MASUDA K. - Microbiological studies of penicillin production. VI. Studies on sporulation media. J. Antibiotics, Jap. 1951, 3, 493-8.
3. BARNETT H. L. et LILLY V. G. - The effects of biotin upon the formation and development of perithecia, asci, ascospores by Sordaria fimicola. Am. J. Bot. 1947. 34. 196-204.
4. BARNETT H. L. et LILLY V. G. - The relation of thiamin to the production of perithecia by Ceratostomella fimicola. Mycologia 1947. 39. 699-708.
5. BARNETT H. L. et LILLY V. G. - The influence of nutritional and environmental factors upon asexual reproduction by Chaetophora cucurbitarum in culture. Phytopathol. 1950. 40. 80-9.
6. BASU S. N. - Significance of Calcium in the fruiting of Chaetomium species, particularly Ch. globosum. J. gen. Microbiol. 1951. 5. 231-8.
7. BASU S. N. - "Chaetomium brasiliensis" Batista and Pontua I: nutritional requirements for growth and fruiting. 1952. J. gen. Microbiol. 1952. 6. 199-204.
8. BASU S. N. et BOSE R. G. - Factors affecting the fruiting of Chaetomium species. J. gen. Microbiol. 1950. 4. 132-40.
9. BERTRAND, G. - Sur le rôle capital du manganèse dans la production des conidies de l'Aspergillus niger. Ann. I. P. 1912, 26. 773-7.
10. BRETZIOFF C. N. - Fungus fruiting in submerged culture. Science 1951. 114. 418-9.
11. BRIAN P. W. et HEMMING H. G. - Some nutritional conditions affecting spore production by Trichoderma viride. Trans. Brit. Micol. Soc. 1950. 33. 132-41.
12. BUSTON H. W. et BASU S. N. - Some factors affecting the growth and sporulation of Chaetomium globosum and Memnoniella echinata. J. gen. Microbiol. 1948. 2. 162.
13. BUSTON H. W., JABBAR A. et ETHERIDGE D. E. - The influence of hexose phosphates, calcium and jute extract on the formation of perithecia by Chaetomium globosum. J. gen. Microbiol. 1953. 8. 302-6.

14. BUSTON H.W. et KING E.J. - Further observations on the sporulation of Chaetomium globosum. J.gen.Micribiol. 1951.5.766-71.
15. CLEGG K.M., KODICEK E. et MISTRY S.P. - A modified medium for Lactobacillus casei for the assay of B vitamins. Biochem.J. 1952. 50.326-331.
16. DIENER U.L. - A method for inducing abundant sporulation of Stemphylium solani. Phytopath. 1952.42.7.
17. EMERIQUE-BLUM L. - Sur la formation d'aneurine par Aspergillum niger au cours de son développement. Cas des carences en magnésium et en phosphore. Bull.Soc.Chim.Biol.(Travaux des Membres). 1942.24.1219-21.
18. FOSTER J.W., Mc.DANIEL L.E., WOODRUFF H.B. et STOKES J.L. - Microbiological aspects of penicillin.V. Conidiospore formation in submerged cultures of P.notatum. J.Bact. 1945.50.365-8.
19. FRANK M.C., CALAM C.T. et GREGORY P.H. - The production of spores by Penicillium notatum. J.gen.Microbiol. 1940.2.70-79.
20. GAILEY F.B., STEFANIAK J.J., OLSON B.R. et JOHNSON M.J. - A comparison of Penicillin producing strains of P.notatum chrysogenum. J.Bact. 1946.52.129-40.
21. GILBERT W. et HICKEY R.J. - Production of conidia in submerged cultures of Penicillium notatum. J.Bact. 1946.51.731-3.
22. HALL R.P. - Effects of certain metal ions on growth of Tetrahymena pyriformis. J.Protozool. 1954.1.74-9.
23. HALL A.N., TIWARI K.S. et WALKER T.K. - The influence of pH value and of carbon source on the nutritional requirements of Acetobacter suboxidans. Biochem.J. 1952.51.XXXVI.
24. HARTELIUS V. et DITLEUSEN R. - Cement blocks, hent stable blocks for ascospore formation in yeast. C.R.Trans.Lab.Carlsberg. Physiol. 1953.25.213-39.
25. HAWKER I.E. - Further experiments on growth and fruiting of Melanospora destruens Shear in the presence of various carbohydrates with special reference to the effects of glucose and of sucrose. AnnBot. 1947. N.S. 11.245-59.
26. HAWKER I.E. - Stimulation of the formation of perithecia of Melanospora destruens Shear by small quantities of certain phosphoric esters of glucose and fructose. Ann.Bot. 1948. N.S. 12.77-9.
27. HAWKER I.E. - The effect of certain growth substances on mycelial growth and fruiting of Melanospora destruens Shear. Trans.Brit.Myc.Soc. 1948.30.135-40.

28. HAWKER L.E.- Causes of formation of fructification organs of fungi (in nature and experimentally). VIIIème Congrès international Botanique. 1954. Rapports et Communications aux Sections 18-19-20. p.91-7.
29. HOLDEN J.T., FURMAN C. et SNELL E.E.- The vitamin B6 group. XVI. D-alanin and the vitamin B6 content of microorganisms. J. biol. Chem. 1949; 178. 789-97.
30. JARVIS F.G. et JOHNSON M.J.- The role of constituents of synthetic media for Penicillin production. J. Am. Chem. Soc. 1947. 69. 3010-7.
31. JARVIS F.G. et JOHNSON M.J. - The mineral nutrition of Penicillium chrysogenum Q-176. J. Bact. 1950. 59. 51-60.
32. JAVILLIER M. et SAUTON B. - Le fer est-il indispensable à la formation des conidies de l'Aspergillus niger? C.R. Ac. Sci. 1911. 153. 1177-80.
33. LILLY V.G. et BARNETT H.L. - The influence of pH and certain growth factors on mycelial growth and perithecial formation by Sordaria fimicola. Am. J. Bot. 1947. 34. 131-8.
34. LILLY V.G. et BARNETT H.L. - The influence of concentration of nutrients, thiamin, and biotin upon growth and formation of perithecia and ascospores by Chaetomium convolutum. Mycologia 1949. 41. 186-96.
35. LINOSSIER J. - Influence du fer sur la formation des spores de l'Aspergillus niger. C.R. Acad. Sci. 1910. 151. 1075-6.
36. LOISELEUR J. - Techniques de laboratoire. Masson edit. Paris 1954.
37. Mac LEOD R.A. - Toxicity of o-phenanthroline for bacteria. Fed. Proc. 1952. 11. (1) 98-9.
38. MAGROU J. et MARNEFFE H. Action de l'aneurine sur la fructification d'un champignon du groupe des Stilbacées. Ann. I. P. 1946. 72. 147-8.
39. MARAVALHAS N. Estudos sobre a esporulação do Penicillium lilacinum Thom. I. Influência da concentração de sulfato de cobre. Arq. Biol. e Tecnol. 1951. 5-6. 79-84.
40. MOYER A.J. et COGHILL R.D. - Penicillin. VIII. Production of Penicillin in surface cultures. J. Bact. 1946. 51. 57-8.
41. MRAK E.M., PHAFF H.J. et DOUGLAS H.C. - A sporulation stock medium for yeasts and other fungi. Science 1942. 96. 432.

42. MULDER E.G. - Sur l'influence du cuivre sur la croissance des microorganismes. Ann.Ferm. 1938. IV.513-33.
43. PONGRATZ E. - Contribution à l'étude du mécanisme de l'action fongistatique et antimétanique de la thiourée. Arch.Sci. (Genève) 1950.3. 288-316.
44. PROOM H. et WOIWOD A.J. - The examination by partition paper chromatography of the nitrogen metabolism of bacteria. J.gen. Microbiol. 1949.3.319-27.
45. RAULIN J. - Etudes chimiques sur la végétation : recherches sur le développement d'une mucédinée dans un milieu artificiel. Thèse Doct.ès Sci.Paris 1870.
46. RICHARDS G.S. - Factors influencing sporulation by Septoria nodorum. Phytopathol. 1951.41.571-8.
47. SAUTON B. - Influence du fer sur la formation des spores de l'Aspergillus niger. C.R. Ac.Sci. 1910.151.241-3.
48. SAUTON B. - Sur la sporulation de l'Aspergillus niger et de l'Aspergillus fumigatus. Ann.I.P. 1913. 27. 328-335.
49. SOMOGYI M. - Notes on sugar determination. J.biol.Chem.1952. 195.19-23.
50. STEINBERG R.A. - Trace elements impurities in nutrient solutions in fungi. Arch.Biochem. 1950.28.111-6.
51. STOCKDALE P.M. - Requirements for the growth and sporulation of Trichophyton persicolor. J.gen.Microbiol.1953 8.434-41.
52. SUSSMAN A.S. - Changes in the permeability of ascospores of Neurospora tetrasperma during germination. J.gen.Microbiol. 1954. 38.59-77.
53. TIMNICK M.B., LILLY V.G. et BARNETT H.L. - Factors affecting sporulation of Diaporthe phaseolorum var. batatatis from soybean, Phytopathol. 1951.41.327-36.
54. TOWNSEND B.T. - Thesis for degree of Ph.D. in the University of Bristol 1952. in HAWKER L.E. 1954. p.94 (reference 28)
55. WILLIAMS O.B. et NEWTON A. - Sporulation by Hansenula mrakii on vegetable media. Mycopathol.Mycologia applicata 1951. 6. 1-6.

T A B L E D E S M A T I E R E S

RECHERCHES SUR LES FACTEURS DE LA FORMATION DES CONIDIES EN MILIEUX LIQUIDES AGITES CHEZ PENICILLIUM CASEICOLUM BAINIER (P.CANDIDUM LINK) ET PENICILLIUM CHRYSOGENUM THOM.

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>HISTORIQUE</u>	
Cations	3
Aliments carbonés, azotés, et facteurs de croissance	7
pH	12
Température	13
Humidité, dessiccation	14
Aération	14
Lumière, obscurité	15

METHODES ET TECHNIQUES

A. Espèces et souches étudiées	16
B. Conservation des souches	17
C. Milieux chimiquement définis	18
D. Conditions d'ensemencement et de cultures	22
E. Techniques microscopiques	23
F. Techniques chimiques	24

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Expériences avec Penicillium caseicolum Bainier

1. Effet du pH initial du milieu	27
2. Effet de l'épuisement du glucose dans le milieu	31
3. Effet de l'épuisement du nitrate dans le milieu	32
4. Effet de l'ammoniaque à divers pH	34

5. Effet de la concentration de divers cations	36
6. Recherches des acides organiques produits dans les milieux de culture à divers pH initiaux	39
7. Effet de l'addition d'acides organiques sur la croissance et la formation des conidiophores	43
8. Effet de l'addition d'agents complexants	44
9. Centrifugation des cultures et échange culots-surnageants	45
10. Inhibition de la formation des conidiophores en présence d'une source d'azote aminé	46
11. Passages en série dans des milieux de cultures à pH initial 3,0 et 5,0 en absence ou en présence d'alanine	48

II. Expériences avec *Penicillium chrysogenum* Thom

1° Cultures à divers pH initiaux	52
2° Remplacement du nitrate par le sulfate d'ammoniaque	53
3° Cultures dans le milieu dynamiquement tamponné de JARVIS et JOHNSON	53
4° Effet de la présence d'alanine	54

DISCUSSION

1. pH	57
2. Cations	57
3. Agents complexants	58
4. Effet de l'aliment carboné	58
5. Effet du nitrate	58
6. Source d'azote aminé	60

CONCLUSIONS

61

BIBLIOGRAPHIE

65

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

“Les aspergillales : caractères généraux,
fructifications et systématique”

Vu et approuvé :

Paris, le 26 Mai 1956

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

VU

et Permis d'imprimer

*Le Recteur de l'Académie
de Paris*

Jean SARRAILH

